

## 論文の内容の要旨

氏名：柄 澤 瑤 子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：骨芽細胞の細胞外マトリックスタンパク代謝と破骨細胞分化の調節に及ぼす伸展力の影響

歯科矯正治療において、歯に加える矯正力が歯槽骨のリモデリングを引き起こすことが知られている。すなわち、圧迫側では骨吸収が、牽引側では骨形成がそれぞれ優位となり、歯の移動が引き起こされる。骨芽細胞は高いアルカリフォスファターゼ活性を有し、コラーゲン性および非コラーゲン性の細胞外マトリックス (ECM) タンパクを産生して、骨形成の中心的な役割を担っている。また、骨芽細胞は、破骨細胞性骨吸収にも関与することが知られている。骨芽細胞は、破骨細胞の分化を促進する receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) や macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) および RANKL の decoy 受容体である osteoprotegerin (OPG) を産生して、破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化と成熟を調節する。さらに、骨芽細胞はタンパク分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) とその内因性阻害剤である tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) を産生して、破骨細胞が骨表層に吸着するプロセスで重要となる osteoid 層の ECM タンパク分解にも関与する。

矯正力を想定して、伸展力 (TF) を骨芽細胞に負荷したこれまでの *in vitro* 研究においては、適度な TF 負荷がアルカリフォスファターゼ活性と ECM タンパク発現を増加させる一方で、過度な TF 負荷は、骨芽細胞による石灰化物形成を抑制することが報告されている。しかし、TF 負荷が骨芽細胞によって産生される ECM タンパク分解酵素とその内因性阻害剤、および破骨細胞分化調節因子の発現に及ぼす影響を調べた研究は少なく、その詳細は不明である。著者は、骨芽細胞の骨形成能を促進する適度な TF 負荷は、骨芽細胞による ECM タンパク分解や、骨芽細胞を介した破骨細胞分化誘導を抑制し、総じて骨吸収よりも骨形成が優位となるのではないかと考えた。

そこで、本研究では、骨芽細胞様細胞として MC3T3-E1 を用いて、骨形成機能を促進することが報告されている強度の TF 負荷が、MMPs および TIMPs 発現に及ぼす影響を調べた。MC3T3-E1 への TF の負荷には、Flexercell Strain Unit を用いた。すなわち、MC3T3-E1 を表面が親水性の flexible-bottomed 6-well plates に播種し、Flexercell Strain Unit に設置後、コンピューター制御下で plate 底面を吸引し、6 cycles/min (5 sec strain, 5 sec relaxation) で 24 時間、周期的な TF を負荷した。その結果、TF 負荷によって、MMP-1, MMP-3 および MMP-13 発現が減少し、TIMP-2 および TIMP-3 発現は増加した。また、MMP-2 および MMP-14 発現、ならびに TIMP-1 および TIMP-4 発現には TF 負荷の影響が認められなかった。MMP-1 および MMP-13 は主にコラゲナーゼとして働き、osteoid 層中で最も多量に存在する未変性の I 型コラーゲンの三重らせん構造を、3:1 の長さの断片に分解する。また、MMP-3 はストロムライシン-1 として、プロテオグリカン、ゼラチンおよびその他の非コラーゲン性タンパクを分解する。一方、TIMP-2 は MMP に、TIMP-3 は ECM タンパクにそれぞれ結合することで、MMPs の活性を阻害する。すなわち、本研究結果から、TF 負荷は、骨芽細胞による ECM タンパク分解過程を抑制すると考えられた。

次に、TF 誘導性の MMP-1, MMP-3 および MMP-13 の発現減少、ならびに TF 誘導性の TIMP-2 および TIMP-3 の発現増加に関与する細胞内シグナル伝達経路を明らかにするために、MC3T3-E1 内の mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達因子のリン酸化に及ぼす TF 負荷の影響を調べた。その結果、TF 負荷によって extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 のリン酸化が減少した一方で、stress-activated protein kinases/c-jun N-terminal kinases (SAPK/JNK) のリン酸化は増加したが、p38 MAPK のリン酸化には変化が認められなかった。また、ERK1/2 の特異的なリン酸化阻害剤である PD98059 は、MMP-1, MMP-3 および MMP-13 発現を抑制したが、TIMP-2 および TIMP-3 発現には影響しなかった。一方、SAPK/JNK の特異的なリン酸化阻害剤である SP600125 は、TF 誘導性の TIMP-2 および TIMP-3 の発現増加を完全にブロックしたが、TF 誘導性の MMP-1, MMP-3 および MMP-13 の発現減少には影響しなかった。これらの結果から、TF 誘導性の MMPs の発現減少と TIMPs の発現増加には、ERK1/2

のリン酸化減少と SAPK/JNK のリン酸化増加が同時に生じる必要があると考えられた。

本研究ではさらに、TF 負荷が MC3T3-E1 の破骨細胞分化調節因子の発現に及ぼす影響を検討するために、RANKL、M-CSF および OPG 発現を調べた。その結果、TF 負荷によって RANKL 発現は減少し、OPG 発現は増加したが、M-CSF 発現に変化は認められなかった。本研究結果から、TF 負荷は、M-CSF 発現に影響しないものの、RANKL 発現減少と OPG 発現増加を介して破骨細胞の分化を抑制する可能性が考えられた。

以上の結果から、TF 負荷は、骨芽細胞内の MAPK シグナル伝達経路を介して MMP-1、MMP-3 および MMP-13 の発現減少ならびに TIMP-2 および TIMP-3 の発現増加を誘導し、osteoid 層における ECM タンパク分解を抑制することが明らかとなった。また、TF 負荷は、骨芽細胞による RANKL 発現減少ならびに OPG 発現増加を誘導し、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を抑制する可能性が示唆された。